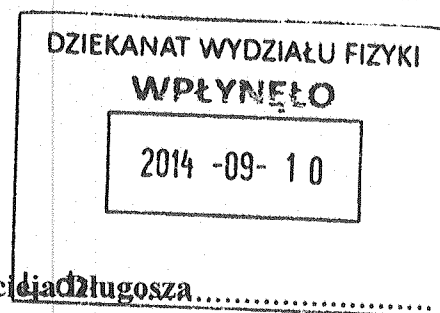


Prof. dr hab. Wiesław Nowak
Zespół Teoretycznej Biofizyki Molekularnej
Zakład Biofizyki i Fizyki Medycznej
Instytut Fizyki
Uniwersytet M. Kopernika w Toruniu
87-100 Toruń
ul. Grudziądzka 5

Toruń 30.08.2014 r.



Recenzja rozprawy habilitacyjnej dr. Macieja Długosza.....
pt.

*„Dynamika brownowska w modelowaniu dyfuzji i asocjacji biomolekuł
– efekty anizotropii, oddziaływań hydrodynamicznych i molekularnego tłoku”
(zbiór publikacji)
oraz
ocena dorobku naukowego habilitanta.*

Żyjemy w czasach ogromnego postępu technologicznego w dziedzinie obliczeń komputerowych. Fakt ten otwiera nowe możliwości badawcze, m.in. w fizyce. Nie będą one wykorzystane, jeśli postępowi technicznemu nie będzie towarzyszył rozwój nowych metod obliczeniowych i symulacyjnych. Prace dr M. Długosza lokują się w tym ważnym rejonie nauki. Obiektami badań są modelowe kompleksy białkowe, zaś zagadnienia jakie analizuje habilitant dotyczą fundamentalnych procesów fizycznych odbywających się w rozworach o szerokim zakresie zmienności stężeń. Formalizm teoretyczny stosowany w obliczeniach był rozwinięty uprzednio przez innych autorów. Układy takie badane były w pewnym stopniu doświadczalnie, jednak pewne aspekty dynamiczne można poznać dopiero wykonując modelowanie w ściśle kontrolowanych warunkach. W szczególności, bardzo ciekawy jest problem roli kształtu białek dla realizacji wszystkich funkcji fizjologicznych jakie one pełnią w organizmach. Czy struktura przestrzenna, jednak mocno zmienna w różnych układach biologicznych ma znaczenie przy tworzeniu kompleksów i dalszej regulacji metabolizmu? Jak efektywnie badać ruchy dużych molekuł i ich agregacje w warunkach zbliżonych do fizjologicznych? Czy silne „zatłoczenie”, tj. obecność wielu „dużych” składników w cytoplazmie, ma wpływ na rotację nieregularnie zbudowanych makromolekuł? Przedstawiona mi do recenzji rozprawa habilitacyjna dr. Macieja Długosza, stanowiąca cykl 6 wieloautorskich publikacji, dotyczy tej ważnej i aktualnej tematyki.

W publikacjach składających się na spójny tematycznie cykl badane są procesy asocjacji kontrolowanej przez dyfuzję białek, ze szczególnym uwzględnieniem roli oddziaływań

hydrodynamicznych. Tworzenie kompleksów jest jednym z podstawowych procesów zachodzących w komórkach, a przebieg tego zjawiska w warunkach zatłoczenia jest raczej słabo zbadany. W celu oceny roli pewnych czynników habilitant proponuje stosowanie znanej od dawna symulacji dynamiki brownowskiej. Rozwija i ulepsza potrzebne do tych badań oprogramowanie. Obliczenia wykonane własnymi programami, z wykorzystaniem GPU, w dobrze dobranych układach modelowych, przyniosły nowe i ciekawe wyniki wskazujące na możliwą rolę niesferycznego kształtu cząsteczek w szybkości tworzenia kompleksów białkowych *in vivo*. Uważam, że badania przedstawione przez dr M. Długosza (i współautorów) wnoszą istotny wkład do fizyki molekularnej i biofizyki.

Poniżej przedstawię krótkie omówienie 6 publikacji składających się na rozprawę wraz z moim komentarzem i uwagami krytycznymi, a następnie dokonam oceny dorobku naukowego habilitanta.

Rozprawę stanowi zbiór 6 prac (A-F) współautorskich (2-4 autorów), o zbliżonej i logicznie połączonej tematyce, opublikowanych w dobrych czasopismach fizykochemicznych z listy filadelfijskiej w latach 2011- 2014: BMC Biophys. – 1x (IF=1.67), J. Chem. Theory and Comp - 2x (IF = 5.4), J. Comp. Chem. 1x (IF = 4.58) J. Phys. Chem. B - 2x (IF = 3,6). Łączna objętość tych artykułów to 57 strony drobnego druku, Łączny IF prac składających się na habilitację wynosi 24.3. Rozprawa opatrzona jest autorskim, bardzo ogólnie napisanym komentarzem (15 str., ok. 15 poz. lit.), nie będącym przedmiotem niniejszej oceny.

W pracy A (Długosz and Trylska, BMC Biophysics 2011, 4:3, *Diffusion in crowded biological environments: applications of Brownian dynamics*) autorzy prezentują zwięzły przegląd aktualnych podejść do problemu badania dyfuzji w zatłoczonych środowiskach metodami symulacji komputerowych. Praca ta jest napisana w standardowy sposób, dobrze zdaje sprawę ze stanu wiedzy, zawiera kilka porównań zaproponowanych w literaturze metod i autorskich komentarzy, ilustruje dobrą orientację w dziedzinie, ale nie wnosi nowych wyników. W publikacji tej nie ma też jasno zarysowanych otwartych problemów badawczych, cenną zawartością jest próba hierarchizowania stosowanych dotychczas podejść do uwzględniania oddziaływań hydrodynamicznych pomiędzy biomolekułami. Włączenie tego artykułu przeglądowego do cyklu prac habilitacyjnych uważam za uzasadnione, gdyż jest to krótkie wprowadzenie do tematyki rozwijanej w kolejnych publikacjach habilitanta.

W pracy B (Długosz, Zieliński, Trylska, J. Comp. Chem. **32** (2011) 2734-44 , *Brownian Dynamics Simulations on CPU and GPU with BD_BOX*) zaprezentowane jest główne narzędzie obliczeniowe – program BD_BOX. Praca napisana jest wyjątkowo solidnie, zawiera dobre wprowadzenie do metod symulacji zaprogramowanych w nowatorskim kodzie, dobre osadzenie w literaturze fizycznej, wyraźny opis możliwości prezentowanego programu i dyskusję jego ograniczeń. Autorzy włożyli wiele wysiłku w optymalizację wydajności, m.in. poprzez wektoryzację. Widać wysiłek, by program zawierał najnowsze rozwiązania, m.in. okresowe warunki brzegowe i sumowanie Ewalda dla tensora D. Cenną cechą nowego programu jest możliwość wykorzystania do realizacji kroków dynamiki brownowskiej nie tylko klasycznej faktoryzacji Choleskiego dla tensora dyfuzji (wg oryginalnego pomysłu Ermaca Mc Cammona, skalowanie N^3), ale też zaprogramowanie nowszej metody Gayera i Wintera (2009), która skaluje się jak N^2 . Zaletą trudną do przecenienia jest możliwość realizacji obliczeń w technologii CUDA, z wykorzystaniem coraz tańszych kart graficznych. Pewnym ograniczeniem jest stosowanie w tej wersji pojedynczej precyzji do reprezentacji zmiennych. Program jest udostępniony w wersji źródłowej (licencja GNU) zainteresowanym badaczom. Tworzenie nowych narzędzi do symulacji jest znaczącym fragmentem wkładu do fizyki molekularnej. Wg oświadczeń współautorów rola dr Długosza była tutaj wiodąca, chociaż samo programowanie realizował p. Zieliński.

Praca C (Długosz, Antosiewicz, Zieliński, Trylska, J. Phys. Chem. B **116** (2012) 5437-47, *Contributions of Far-Field Hydrodynamic Interactions to the Kinetics of Electrostatically Driven Molecular Association*) zawiera pierwsze istotnie nowe wyniki badawcze. Modelowane były układy dwóch oddziałujących obiektów (sferycznych lub “hantli”) naładowanych przeciwnie lub neutralnych w sytuacji opisującej roztwór (*implicit solvent*) o zmiennej sile jonowej. Badany był efekt oddziaływań hydrodynamicznych na tempo dyfuzji asocjacyjnej. Śledzony był przy tym efekt anizotropii kształtu oraz początkowej konfiguracji oddziałujących obiektów modelowych. W tym przypadku nie stosowano przybliżeń opisujących zatłoczenie molekularne. Podobne badania zbliżonymi metodami były prowadzone w przeszłości ale nie w tak systematyczny sposób i nie w tych samych przybliżeniach. Wyniki były zgodne z wcześniejszymi obserwacjami, iż oddziaływania hydrodynamiczne spowalniają tempo dyfuzji. Nowością jest jednak zaskakujące spostrzeżenie, że preorientacja (wzajemne ustawienie początkowe) obiektów anizotropowych przejawia się w zmiennej zależności (wielkości) efektów hydrodynamicznych (HI) od mocy jonowej. Prowadzi to do hipotezy o możliwości występowania sterowania hydrodynamicznego przy

tworzeniu kompleksów złożonych z białek. Efekt ten, o ile nie jest artefaktem, musi być oczywiście potwierdzony w innych badaniach. Publikacja ta jest moim zdaniem elegancka, badania przemyślane i systematyczne, wyniki interpretowane są krytycznie i wnikliwie. Ich wartość osłabia grube przybliżenie stosowane do opisu kompleksów, no i oczywiście rezultaty są zależne od przyjętego modelu oddziaływań hydrodynamicznych. Praca C, chociaż jest nierewolucyjna, jest moim zdaniem przykładem systematycznych badań złożonych układów molekularnych niemożliwych do przeprowadzenia ani na drodze rozważań analitycznych, ani na drodze czystych doświadczeń. W pracy zaprezentowano solidny warsztat naukowy.

Wątek zainicjowany w pracy C był dalej rozwijany w symulacjach, które opublikowano w **artykule D** (Długosz, Antosiewicz, J. Phys. Chem. B, **117** (2013) 6165-74, *Hydrodynamic Effects on the Relative Rotational Velocity of Associating Proteins*). Autorzy zajęli się badaniem procesu tworzenia silnego kompleksu molekularnego barnaza-barstar (BB). Struktura przestrzenna tego kompleksu jest znana, jest to popularny obiekt w symulacjach i pomiarach AFM. W tym przypadku model białek był bardziej realistyczny, nie polegał tylko na aproksymacji białka sferą, a uwzględniał kształt kompleksu obserwowany w krystalografii. Rezygnując ze szczegółowych symulacji (kosztownych w takim układzie) dynamiką brownowską oraz stosując nieco inną metodykę (program HYDROLIB K. Hinsena) Autorzy rozszerzyli obliczenia na śledzenie dyfuzji rotacyjnej tych anizotropowych białek. W pracy nie ma nowych teorii dynamiki, jest za to pomysłowe i krytyczne wykorzystanie opublikowanych metod i schematów obliczeniowych do badania wpływu HI na prędkości rotacji asocjujących fragmentów w funkcji wzajemnej orientacji i parametrów fizycznych ośrodka. Praca ta przynosi szereg nowych wyników nt. możliwych efektów preorientacji i wspomagania asocjacji poprzez sterowanie hydrodynamiczne i elektrostatykę. Byłoby bardzo ciekawe gdyby udało się bez wątplenia udowodnić postawioną w tej publikacji śmiałą hipotezę (wniosek z obliczeń), iż oddziaływania hydrodynamiczne spowalniają obroty B i B wtedy gdy ich wzajemnie ułożenie jest korzystne dla asocjacji, zaś przyspieszają je, wówczas gdy ich ustawienie nie jest optymalne do utworzenia kompleksu. Autorzy zwracają uwagę, że poziom „gruboziarnistości” modelu zastosowanego do opisu struktury agregujących białek ma znaczenie jakościowe w opisie zjawisk hydrodynamicznych. Również ta publikacja ma moim zdaniem spory ładunek nowości i oryginalnych analiz.

Bardzo ładna jest **praca E** (Długosz, Antosiewicz, J. Chem. Theory and Comp., 9 (2013) 1667-77, *Anisotropic Diffusion Effects on the Barnase–Barstar Encounter Kinetics*), w której w szczegółowy i przekonujący sposób pokazano, iż w niektórych warunkach proces tworzenia kompleksu białkowego (barnaza-barstar) może być w pewnym stopniu ułatwiany anizotropowymi oddziaływaniami hydrodynamicznymi. Autorzy zgromadzili pokaźny zestaw danych z symulacji brownowskiej (130 trajektorii BD, 1.3 ms) obliczonych swoim programem BD_BOX. Dokonali starannej analizy i dyskusji kinetyki powstawania kompleksu przejściowego BB. W pomysłowy sposób wprowadzili efekty sterowania elektrostatycznego do rozważań kinetycznych i ograniczenia przestrzeni „reakcji”. Stwierdzili, że chociaż niewielka w ich przykładzie, ale jednak wyraźna anizotropia w kształcie obu białek, może w pewnych warunkach przyspieszać reakcję (zwiększać stałą asocjacji) nawet do 20%. Efekt ten, dyskutowany wcześniej w literaturze, wywołany jest czynnikami sterycznymi. Warto podkreślić w tym miejscu, że omawiana publikacja nie jest wynikiem „blackboxowego” zastosowania programu symulacyjnego BD_BOX, wymagała ona starannego, wieloetapowego przyjmowania konkretnych przybliżeń, rozumienia fizyki fazy skondensowanej, krytycznej oceny rezultatów i ostrożnego wyciągania wniosków. Mam wrażenie, że jest to jedna z lepiej udokumentowanych publikacji w dziedzinie symulacji dynamiki brownowskiej.

Cykl zamyka **praca F** (Długosz, Antosiewicz, J. Chem. Theory and Comp. 10 (2014) 481-91, *Evaluation of Proteins' Rotational Diffusion Coefficients from Simulations of Their Free Brownian Motion in Volume-Occupied Environments*), w której wreszcie Autorzy bezpośrednio zajmują się dyfuzją rotacyjną białka w środowisku zbliżonym do występującego w komórkach (zatłoczenie molekularne). Problem wpływu licznych partnerów białek na ich wzajemne oddziaływania (*molecular crowding*) który pojawił się stosunkowo niedawno, jest obecnie bardzo modny. Obserwuje na biofizycznych konferencjach międzynarodowych coraz więcej doniesień z tym związanych. Fizyka ma tutaj konkretne wyzwania, ponieważ proste przeniesienie wzorów np. z teorii roztworów koloidalnych, tutaj nie działa ze względu (m.in.) na wyjątkową heterogeniczność środowiska. Zatem habilitant znalazł do badań ciekawy fragment słabo poznanego (nano)kosmosu.

W omawianej publikacji analizowane są wyniki serii symulacji układu złożonego z 220 cząsteczek lizozymu (małego białka) traktowanego w przybliżeniu bryły sztywnej. Uwzględnione są tylko oddziaływania steryczne. Badane są roztwory o stężeniach od 1.25 do 120 mg/ml. Główny wynik, to spostrzeżenie, iż uproszczony izotropowy opis dyfuzji rotacyjnej w pewnych reżimach stężeń jest niewłaściwy – proces jest czuły na anizotropię

budowy analizowanego białka. Efekty liczbowe nie są może znaczne (2%) ale wyniki z pewnością wnoszą wkład do lepszego zrozumienia tych ważnych w naturze roztworów. Również ta praca zawiera szereg pomysłowych analiz i porównań, wnosi nowe informacje o roli zatłoczenie w przebiegu dyfuzji, pokazuje w jakich zakresach czasowych mawiane efekty występują a w jakich opis asymptotyczny jest wystarczający. Może trudno jest wskazać obecnie bezpośrednio zastosowania omawianych rezultatów, mają one na razie charakter podstawowy, jednak otwierają nowe perspektywy w doskonaleniu modeli teoretycznych heterogenicznych roztworów makromolekuł o dużym stężeniu. Ciekawym będzie zbadanie sytuacji w której oddziaływania białko-białko będą opisane w pełni, czy wspomniane efekty nie zostaną całkowicie stłumione np. elektrostatyką?

Z oświadczeń niewielkiej grupy współautorów wynika, że dr M. Długosz miał kluczowy udział w tworzeniu każdej publikacji wchodzącej w skład omawianego zbioru.

Resumując omówienie zestawu publikacji stwierdzam, że do najważniejszych osiągnięć naukowych dr M. Długosza można zaliczyć:

- (a) pomysł napisania własnego, opartego o GPU, programu do obliczeń dynamiki brownowskiej w różnych modelach teoretycznych (b) udział w realizacji tworzenia nowego narzędzia badawczego BOX_BD (c) systematyczne zbadanie na prostych i bardziej złożonych modelach efektów anizotropii w dyfuzji białek (d) odkrycie wpływu anizotropii w niektórych zakresach stężeń na rotacje w warunkach tłoku molekularnego.

Są to dość istotne rezultaty, wnoszą one, moim zdaniem, zauważalny wkład do metodyki badań fizyki molekularnej i biofizyki.

Ponieważ większość wyników opublikowano w czasopismach wydawanych przez ACS, można zastanawiać się, czy prace prowadzone przez dr Długosza należą do fizyki czy raczej do chemii fizycznej. Jestem zdania, że jest to obszar badań interdyscyplinarnych, z przewagą metodyki właściwej fizyce (fizyka komputerowa). Z racji badanych obiektów (białka w roztworach mają one oczywiście silną komponentę biofizyczną.

Dorobek naukowy habilitanta jest dobry.

Jest On współautorem 21 (+6) opublikowanych prac twórczych w renomowanych czasopismach z tzw. listy filadelfijskiej, m.in. w Phys Rev. E, 4x J. Phys Chem B, 2x Eur. J. Biophys., J. Chem. Phys., Chem. Phys., J. Med. Chem, J. Comp. Chem., PLOS Biology (IF=11). 13 (+6) prac ukazało się po uzyskaniu stopnia doktora, tj. w ciągu ostatnich 8 lat (2006-2014). Prace te są zawsze wieloautorskie, habilitant jest pierwszym (lub głównym) autorem w 11 pracach. Liczba obcych cytowań prac dr. M. Długosza (Web of Science 1.09.2014) sięga 146 i dynamicznie rośnie. Wartość indeksu Hirscha $h=8$ i zważywszy na tematykę nie jest wysoka, jednak jestem przekonany, że prace opublikowane w dobrych czasopismach w ostatnich 2 latach zostaną zauważone i ten wskaźnik wzrośnie. Pozytywny jest wyraźny wzrost (w funkcji czasu) rangi czasopism, w których ukazują się prace habilitanta.

Tematyka tych prac jest urozmaicona. Przed doktoratem dr M. Długosz publikował głównie prace z zakresu tzw. miareczkowania komputerowego, symulacje różnych układów w warunkach stałego pH. Zajmował się także opisem teoretycznym i analizą eksperymentów wykonywanych techniką zatrzymanego przepływu (kinetyka biochemiczna). Niektóre z tych prac uzyskały po kilkadziesiąt cytowań. Z pewnością jest ekspertem w dziedzinie modelowania molekularnego struktury i dynamiki cząsteczek. Znaczna część prac związana jest z opisem własności potencjalnych leków. Szczególnie ciekawe wydają się publikacje z okresu po nawiązaniu współpracy (postdoc) z prof. Joanną Trylską, dotyczące antybiotyków oddziałujących z rybosomami bakteryjnymi. Istotny był wkład dr M. Długosza w stworzenie nowego narzędzia badawczego – programu RedMD do obliczeń gruboziarnistej MD. Habilitant zajmował się także fascynującym procesem – transportem molekularnym na mikrotubulach z udziałem kinezy.

Mimo wielu zagadnień szczegółowych, charakterystycznych dla przebiegu większości współczesnych karier naukowych, widzę wyraźny profil „ ekspercki” w aktywnościach dr. Długosza. W zespołach pełnił On ważną rolę nie tylko wykonawcy obliczeń (często) ale osoby interpretującej dane, wysuwającej hipotezy i wyciągającej wnioski w oparciu o zaawansowane formalizmy matematyczne czy fizyczne. Ten rodzaj wkładu intelektualnego świadczy o samodzielności i w nauce jest potrzebny.

Dr M. Długosz ukończył studia magisterskie z biofizyki na UW w roku 2002. Dokumentacja nie wskazuje co robił po ukończeniu studiów. W roku 2006 uzyskał (z wyróżnieniem) doktorat z fizyki. Przez rok po doktoracie, pracował w IBB PAN w Warszawie jako asystent. Następnie był referentem i adiunktem w ICM UW, 01.2012 zatrudniony jest jako adiunkt w CNT UW w Warszawie. W międzyczasie odbywał staż podoktorski w ramach projektu FOCUS FNP w grupie dr hab. J. Trylskiej na UW. Wydaje się, że odbył staż krótkoterminowy w grupie prof. McCammona w USA. W latach 2012-15 otrzymuje stypendium MNiSZW dla szczególnie zdolnych młodych naukowców.

Był kierownikiem grantu własnego NCN (20111-14) oraz wykonawcą w co najmniej 5 grantach krajowych i kolaboracji międzynarodowej. Wygłosił 10 referatów na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych (USA, Tajwan, Julich, Goeteborg) Wielokrotnie pełnił funkcję recenzenta w światowych czasopismach naukowych.

Dr M. Długosz oprócz działalności naukowej w zasadzie nie prowadził działalności dydaktycznej. Przez dwa lata opiekował się studentami stażystami w ICM, miał pod swoją opieką jednego magistranta. Funkcję opiekuna pracy sprawował b. rzetelnie – praca mgr zdobyła wyróżnienie w konkursie ogólnopolskim. Działalność dydaktyczna habilitanta, zapewne z obiektywnego powodu jakim był rodzaj zatrudnienia, jest poniżej przeciętnej.

Niczego pozytywnego nie mogę też napisać na temat działalności organizacyjnej. Oczywiście nie ten dział decyduje o nadaniu stopnia naukowego, jednak brak aktywności pozanaukowej może wskazywać na brak wszelkich zdolności organizacyjnych i nieznamość realiów samodzielnego uprawiania nauki z Polsce. Mój krytycyzm i podejrzenie o programową „społeczność” osłabia silne zaangażowanie się dr M. Długosza społeczną pracę w dziedzinie „peer review” oraz kierowanie samodzielne dużym grantem badawczym NCN.

Podsumowując stwierdzam, że mimo skromnych osiągnięć dydaktycznych i braku poważniejszego dorobku organizacyjnego, oceniam pozytywnie osiągnięcia doktora Macieja Długosza. Uzyskane przez Niego w krótkim czasie wyniki składające się na rozprawę habilitacyjną są w większości nowatorskie, dają wkład do dziedziny oraz mają konkretne znaczenie dla fizyki. Również różnorodny dorobek naukowy spoza tematyki objętej rozprawą zasługuje na dobrą ocenę - został on zauważony w nauce światowej. Uważam, że rozprawa habilitacyjna oraz dotychczasowy dorobek naukowy spełniają warunki niezbędne do

ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego i wnioskuję o dopuszczenie
doktora Macieja Długosza do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.

W. Nowak